

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

平2-306992

⑬ Int. Cl.⁸
C 07 H 19/06
C 12 P 19/40
// A 61 K 31/71
C 12 N 1/20
(C 12 P 19/40
C 12 R 1:465)

識別記号 庁内整理番号
ADZ 7822-4C
A 8214-4B
6807-4B

⑭ 公開 平成2年(1990)12月20日

審査請求 未請求 請求項の数 3 (全9頁)

⑮ 発明の名称 抗生物質 RK-1061G 及び RK-1061H 並びにその製造法

⑯ 特 願 平1-127079

⑰ 出 願 平1(1989)5月20日

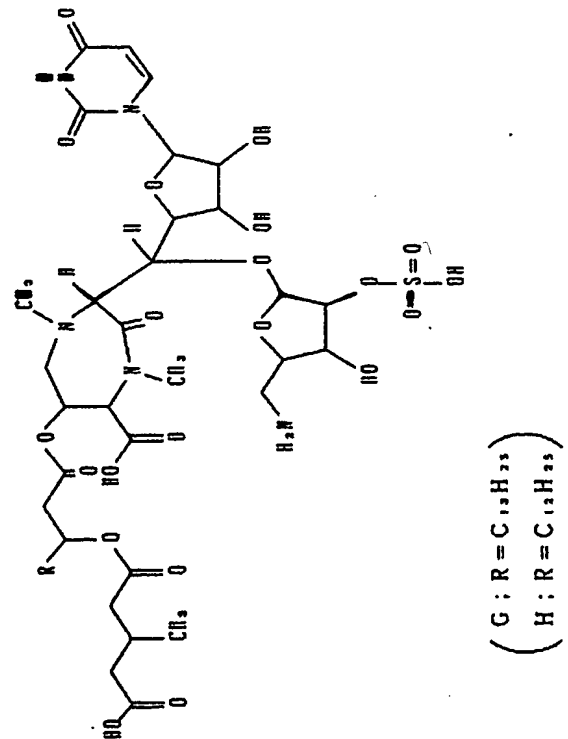
⑱ 発 明 者 磯 野 清 埼玉県和光市広沢2番1号 理化学研究所内
⑲ 発 明 者 生 方 信 埼玉県和光市広沢2番1号 理化学研究所内
⑳ 発 明 者 日 下 部 寛 男 埼玉県和光市広沢2番1号 理化学研究所内
㉑ 出 願 人 理 化 学 研 究 所 埼玉県和光市広沢2番1号
㉒ 代 理 人 弁 理 士 中 村 稔 外7名

明 細 書

1. 発明の名称 抗生物質 RK-1061G 及び
RK-1061H 並びにその
製造法

2. 特許請求の範囲

(1) 下記の式で表される抗生物質 RK-1061
G 及び RK-1061H。



(2) ストレプトミセス (*Streptomyces*) 属に属する抗生物質 RK-1061G 及び RK-1061H 生産菌を培養し、その培養物から抗生物質 RK-1061G 及び RK-1061H をそれぞれ分離採取することを特徴とする抗生物質 RK-1061G 及び RK-1061H の製造法。

(3) 抗生物質 RK-1061G 及び RK-1061H 生産菌が *Streptomyces*・エスピー・RK-1061 (*Streptomyces* Sp. RK-1061) である請求項2記載の製造法。

3. 発明の詳細な説明

〔産業上の利用分野〕

本発明は、新規抗生物質及びその製造法に関する。

〔発明の背景〕

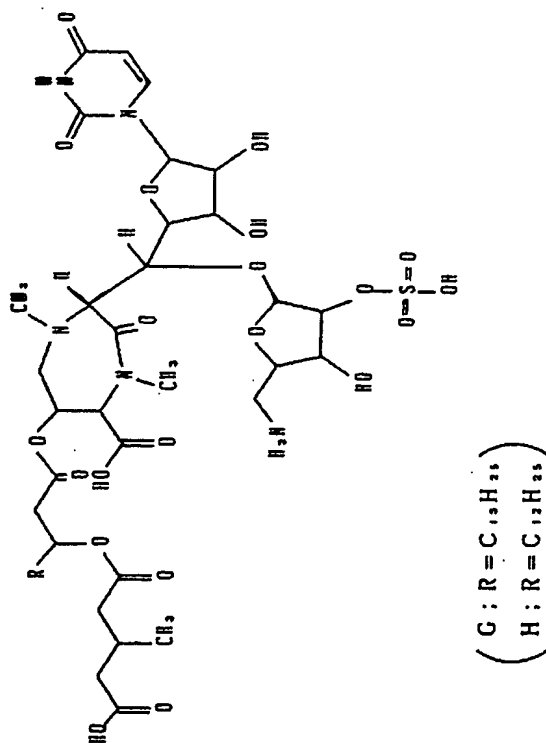
本発明者は、新規抗生物質の探索を目的として多数の土壌中から微生物を分離し、その産生する抗生物質を分離探索し、ストレプトミセス属に属する微生物の培養液及び培養菌体に文献未載の新規抗生物質 RK-1061A、RK-1061B 及び RK-1061C が産生、蓄積されること、
 ・ 新たな知見を得た (特開昭61-282088号公報参照)。本発明者は、上記微生物の産生物につき更に研究を行った結果、上記 RK-1061A、RK-1061B、RK-1061C とは異なる新規抗生物質を見出し、本発明を完成するに至った。

〔本発明が解決しようとする課題〕

本発明の目的は、新規抗生物質及びその製造法を提供することである。

〔課題を解決するための手段〕

本発明の新規抗生物質は、ストレプトミセス属に属する抗生物質 RK-1061G 及び RK-1061H 生産菌を培養し、その培養物から分離採取される、以下の構造式と後述の理化学的性質及び生物学的性質を有する抗生物質 RK-1061G と RK-1061H を包含する。



(発明の構成)

<使用する微生物>

まず、本発明において用いる微生物は、抗生物質 RK-1061G 及び RK-1061H の生産能を有するものであり、ストレプトミセス属に属する菌種である。

その一例として、ストレプトミセス・エスピー・RK-1061 (*Streptomyces* Sp. RK-1061 (以下“RK-1061株”という))と称される微生物は上記の特性を有し、本発明の抗生物質 RK-1061G 及び RK-1061H を有利に生産するものであり、本発明方法に有効に利用し得るものである。

また、上記 RK-1061 株の自然的及び人工的変異株は勿論、ストレプトミセス属に属する菌種で後述の抗生物質 RK-1061G 及び RK-1061H の生産能を有する微生物はすべて本発明方法において使用することができる。

上記 RK-1061 株は、本発明者により山梨県御坂町で採取された土壤中より発見された土壌

にペプトン化し茶色の透明液を与える。澱粉を加水分解するが、ゼラチンを液化しない。ペプトン・イーストエキス・鉄寒天培地およびチロシン寒天培地上でメラニン色素の生成が認められるが可溶性色素は淡褐色ないし灰色で特徴ある色素の生成は認められない。電子顕微鏡の観察によると気中菌糸は直状柔性であり、オートミール・硝酸塩寒天培地およびポテトエキストラクト・イーストエキストラクト硝酸塩寒天培地上では3～5回のらせん状菌糸がみられ、前者培地では密ならせん状であるが後者ではオープンスパイラルである。一方イーストエキス、モルトエキス寒天培地上に発育したものではありません菌糸は認め難い。本菌の胞子は菌糸先端より多数連なって形成されらせん菌糸部分は胞子化する。胞子表面は平滑であるがしわ状である。胞子の大きさは長さ0.5～1.0マイクロメートル、巾0.5～0.7マイクロメートルである。スポランギアおよび運動性胞子は観察されなかった。

放線菌であり、工業技術院微生物工業技術研究所に昭和60年5月29日付寄託され、その微生物受託号は、微工研菌寄第8278号(FERM P-8278)である。

RK-1061株は、次の菌学的性質を有する。

I. 形態

RK-1061株は山梨県御坂町で採取した土壌より分離した放線菌で全細胞の塩酸加水分解物のペーパークロマトグラフでは、L-ジアミノピメリン酸だけを検出し、メソ-ジアミノピメリン酸は検出されない。各種寒天培地上での生育試験では、試験した10種の全ての培地上に発育するが、スターチ・イーストエキス寒天培地上での発育は良好で気中菌糸と胞子の着生は豊富だが、これ以外の寒天培地上での気中菌糸と胞子の着生は良好でない。11種の糖を炭素源とする利用試験に於ては、本菌は全ての糖を利用し発育する。本菌の気中菌糸は灰色系であり、裏面は淡褐色系であって特徴はない。脱脂牛乳中での発育では始めに凝固を起すが後

II. 各種培地上における生育状態

(27℃ 3週間培養)

色調の記載はディスクリティブ・カラー・ネームズ・ディクショナリー (Descriptive color names dictionary) 第4版の色名記号による。

1. シュクロース・硝酸塩寒天培地

発 育：普通
気 菌 糸：なし
裏 面：2ba (パール)
可溶性色素：なし

2. グルコース・アスパラギン寒天培地

発 育：普通
気 菌 糸：なし
裏 面：2ba (パール)
可溶性色素：なし

3. グリセロール・アスパラギン寒天培地

発 育：普通
気 菌 糸：なし
裏 面：2ba (パール)
可溶性色素：なし

4. スターチ・無機塩寒天培地

発 育： 通

気 菌 糸： な し

裏 面： 2 ba (パール)

可溶性色素： な し

5. チロシン寒天培地

発 育： 普通

気 菌 糸： 少量 b + 3 ni + 4 ni

(オイスターホワイト+コバートブラウン
+チェストナットブラウン)

裏 面： 3 pn (ダークブラウン)

可溶性色素： 3 p l (ディープブラウン)

6. 栄養寒天培地

発 育： 不良

気 菌 糸： な し

裏 面： 3 ng (イエローメイブル)

可溶性色素： 3 ng (イエローメイブル)

7. イーストエキス・モルトエキス寒天培地

発 育： 普通

気 菌 糸： 豊富 c (グレー)

裏 面： 3 pi (ゴールドブラウン)

可溶性色素： 3 pn (ダークブラウン)

8. オートミール寒天培地

発 育： 通

気 菌 糸： 普通 5 ge (ローズウッド)

裏 面： 4 ge (ローズベージュ)

可溶性色素： な し

9. ペプトン・イーストエキス・鉄寒天培地

発 育： 不良

気 菌 糸： な し

裏 面： 2 ba (パール)

可溶性色素： 5 pn (ダークブラウン)

10. スターチ・イーストエキス寒天培地

発 育： 良好

気 菌 糸： 豊富 4 ge + 4 li (ローズベ
ージュ+ビーバー)

裏 面： 4 ge (ローズベージュ)

可溶性色素： 1 ih (オリーブグレー)

Ⅲ. 炭素源の還元性 (ブリッドハム・ゴットリーブ
寒天培地) (27℃培養)

発育状況

1. L-アラビノース	++
2. D-キシロース	+++
3. D-グルコース	++
4. D-フルクトース	+
5. シュクロース	+
6. イノシトール	+
7. L-ラムノース	+
8. ラフィノース	+
9. D-マンニトール	+
10. ラクトース	+++
11. メリビオース	++

+: 発育する

++: 良く発育する

+++ : 非常に良く発育する

Ⅳ. その他の生理的性質 (27℃培養)

1. ゼラチンの液化 (グルコース・ペプトン・
ゼラチン培地)

液化しない。

2. スターチの加水分解 (スターチ・無機塩寒天
培地)

加水分解する。

3. 脱脂牛乳の凝固とペプトン化

凝固しペプトン化する。

4. メラニン様色素の形成

チロシン寒天培地、ペプトン・イースト
鉄寒天培地上での色素の生成がある。

5. 生育温度

20 ~ 35℃

上記の諸性質を有するストレプトミセス属、す
なわち、灰色系でスパイラル菌糸を有し、メラノ
イド様色素を生成し、胞子平面が平滑であり、前
記記載の誌を利用する種をバージェイズ・マニユ
アル・オブ・ディタミネイティブ・バクテリアオーロジ
ー・第8版(Bergey's Manual of Determinative
Bacteriology, 8th edition (1974))により調べ
た。その結果、本菌は、ストレプトミセス・グリ
ゼオスポレウス (Streptomyces griseosporus)

か、これに極めて近縁の種と推定される。

(培養法及び精製法)

本発明の抗生物質 RK-1061G 及び RK-1061H を得るに当っては、ストレプトミセス菌に属する上記抗生物質生産菌を、抗生物質を生産する通常の方法で培養することができる。培養の形態は、液体培養でも固体培養でもよく、工業的に有利に培養するためには、前記生産菌の孢子懸濁液又は培養液を培地に接種し、通気攪拌培養を行えばよい。

培地の栄養源としては特に限定されることはなく、微生物の培養に通常用いられる炭素源、窒素源その他を培地中に含有させることができる。炭素源としては、澱粉、デキストリン、グリセリン、グルコース、シュクロース、ガラクトース、イノシトール、マンニトールなどが、また窒素源としては、ペプトン、大豆粉、肉エキス、米ぬか、鮎、尿素、コーンステイプリカー、アンモニウム塩、硝酸塩、その他の有機または無機の窒素化合物が用いられる。その他、無機塩類、たとえば食塩、

磷酸塩類、カリウム、カルシウム、亜鉛、マンガン、鉄等の金属塩類等を適宜に添加してもよく、必要に応じて消泡剤として、動、植、動物油等を添加してもよい。培養温度、培養時間等の培養条件は使用菌の発育に適し、しかも RK-1061G 及び RK-1061H の生産が最高となるような条件が選ばれる。たとえば、培地の pH は 4~9、特に 6~7 付近がよく、培養の適温は 25~35℃ 程度がよい。しかし、これらの培養組成物、培地の水素イオン濃度、培養温度、攪拌条件などの培養条件は使用する菌株の種類や、外部の条件などに応じて好ましい結果が得られるように適宜調節されるべきであることはいうまでもない。このようにして得られる培養物から、RK-1061G 及び RK-1061H を得るには、代謝産物を採取するのに通常用いられる手段を適宜に利用して採取し得る。たとえば、RK-1061G 及び RK-1061H と不純物との溶解度差を利用する手段、イオン結合力の差を利用する手段、吸着親和力の差を利用する手段、分子量の差を利用す

る手段のいずれも、それぞれ単独、又は、適宜組合わせて、あるいは反復して使用される。具体的には、RK-1061G 及び RK-1061H は、大部分が、その培養濾液に存在するが、菌体中に存在する活性区分は、含水アセトン抽出後アセトンを留去して得られる。これを、前記培養濾液と合わせ、吸着クロマトグラフィー、シリカゲルクロマトグラフィー、紙体クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー等を組合せて精製すると、RK-1061G 及び RK-1061H 及びその他の活性成分を含んだ複合体 (RK-1061 複合体) を得る。吸着クロマトグラフィーの担体としては、ダイヤイオン HP-10 が、液体クロマトグラフィーの担体としては、MC1 GEL CHP-20P が、イオン交換クロマトグラフィーの担体としては、ダウエックス (Dowex) 50WX4 が、またゲル濾過クロマトグラフィーの担体としては、セファデックス LH-20 等が好適である。

得られた RK-1061 複合体を、高速液体ク

ロマトグラフィーに付すと、多成分のピークに分れる。使用カラムは、逆相分配型のものが有利である。

得られたピークのうち、RK-1061G 及び RK-1061H に相当するピークを、それぞれ分取し、濃縮、凍結乾燥することにより、純粋な RK-1061G 及び RK-1061H を、それぞれ得る。

[RK-1061G 及び RK-1061H の理化学的性質、生物学的性質]

- (1) 形 状: RK-1061G 及び RK-1061H のいずれも白色粉末である。
- (2) 融 点: RK-1061G 及び RK-1061H のいずれも 190℃ 以上で分解する。
- (3) 分子量: FAB・マスペクトルによる。

RK-1061G: MH⁺ 1036 (分子式 C₁₈H₂₈N₂O₁₁S)

RK-1061H: MH⁺ 1024 (分子式 C₁₈H₂₈N₂O₁₁S)

(4) 溶解性:

RK-1061G: 水、ジメチルスルホキシドに易溶、
メタノール、エタノールに可溶、
アセトン、酢酸エチル、クロロホルムに不溶である。

RK-1061H: 水、ジメチルスルホキシドに易溶、
メタノール、エタノールに可溶、
アセトン、酢酸エチル、クロロホルムに不溶である。

(5) 核磁気共鳴スペクトル:

400 MHz、溶媒 CD₃OD、標準 TMS

RK-1061G: 第1図のとおり。

RK-1061H: 第2図のとおり。

(6) R_f 値 (シリカゲル薄層クロマトグラフィー):

溶 媒	R _f 値
RK-1061G: ブタノール-メタノール	0.36
水 (4:1:2)	
クロロホルム-メタノール (1:3)	0.68
水飽和ブタノール	0.04
RK-1061H: 同 上	同 上

(7) 呈色反応:

RK-1061G及びRK-1061Hの

1061A、RK-1061Bと同等な抗菌活性を有することが期待でき、ペプチドグリカン合成酵素阻害活性を有することから、抗菌剤としての利用が期待される。

以下に、本発明を実施例によって説明する。

<実施例>

30ℓ容積のジャーフェンターに入れたグルコース2%、可溶性澱粉1%、肉エキス0.1%、酵母0.4%、大豆粉2.5%、食塩0.2%、第二磷酸カリ0.005%の組成よりなる培地18ℓに、あらかじめ同一培地に、前記RK-1061株(微生物菌第8278号)を接種して48~72時間28℃で振盪培養した培養液140mlを接種して28℃で65~70時間、pHが8.4を越えるまで通気攪拌培養を行う。このときの通気量は毎分18ℓ、攪拌回転数は350rpmである。

培養終了後、培養液に濾過助剤セライトを加えて適心濾過し菌体と濾液とに分ける。菌体は80%アセトン15ℓを用いて抽出し、これを減圧濃縮してアセトンを溜去し2.5ℓの水溶液を得る。

いずれも過マンガン酸カリウム溶液を脱色し、アニスアルデヒド-硫酸試薬、アントロン試薬、ニンヒドリン試薬に陽性である。

(8) 塩基性、酸性、中性の区別:

RK-1061G及びRK-1061Hのいずれも濾紙電気泳動法による区別では、両性物質である。

(9) ペプチドグリカン合成酵素阻害活性:

大腸菌より調製したペプチドグリカン合成酵素の粗酵素を用い基質であるUDP-[U-¹⁴C]-N-アセチルグリコサミンのペプチドグリカン面分への取りこみを測定したところ、ペプチドグリカン合成酵素阻害活性が認められた。

以上、本発明の抗生物質RK-1061G及びRK-1061Hの理化学的性質及び生物学的性質を、既知の抗生物質と比較し、新規物質であると結論した。

本発明のRK-1061G及びRK-1061Hは、各種細菌に対して顕微の既知物質 RK-

濾液75ℓ(ジャーフェンター6基分)を、HCℓでpH7.0に調整した後、先に得られた菌体抽出水溶液と共にダイヤイオンHP-107ℓの樹脂塔に通過し、吸着させる。20ℓの水を用いて洗浄後、30%含水メタノール20ℓを用いて溶出を行なうと、不純物が溶出される。次いで、50%含水アセトン40ℓを用いて溶出を行なうと、活性部分が溶出される。これを減圧下に濃縮し、濃縮液6ℓを得る。これに3ℓのn-ブタノールを加えてブタノール抽出を行なう。この操作を3回繰り返して活性成分を含むブタノール層10ℓを得る。ブタノール層を減圧濃縮し、凍結乾燥すると27.9gのRK-1061複合体の粗粉末を得る。この粗粉末をクロロホルム-メタノールの溶剤系を用いてシリカゲルのカラム(6.0×65cm)によりクロマトグラフィーを行なう。活性はクロロホルム-メタノール(1:2)より(1:3)の溶出区分に現われる。活性面分を減圧濃縮し、凍結乾燥すると16.0gの粗粉末が得られる。

この粗粉末を少量の10%含水アセトンに溶解

し、予め同一溶液で調製したMC1-ゲルのカラム(3.0×75cm)にチャージして、10%含水アセトンで十分洗浄の後、50%含水アセトンにて活性成分を溶出する。活性部分を集めて減圧濃縮し、凍結乾燥すると2.5gの粗粉末が得られる。水に不溶の不純物を除くために、水に溶解後室温で2800rpm 10分間の遠心を行なう。上清を減圧濃縮し、凍結乾燥すると1.2gの粗粉末が得られる。

この粗粉末を少量の0.1Mピリジン-酢酸(pH 4.0)の緩衝液に溶解し、予め同一緩衝液で調製した陽イオン交換樹脂Dowex50W×4(100~200mesh)カラム(3.0×80cm)を通過させる。同一緩衝液にて素通りしてきた活性部分を減圧濃縮し、凍結乾燥すると820mgの粗粉末が得られる。

さらに、これをセファデックスLH-20カラム(2.2×72cm)にかけ、30%含水メタノールにて展開し、活性部分を減圧濃縮し、凍結乾燥することによりRK-1061複合体粉末320

mgを得る。

このRK-1061複合体の精製は、逆相カラム(ヌクレオジル5C10、φ8×250mm)を用いた高速液体クロマトグラフィーを、アセトニトリル-0.1%ジエチルアミン・炭酸(34:66)の溶媒系で流速2ml/分にて行なうと公知のRK-1061A及びRK-1061Bのピークを含む多成分のピークに分かれる(第3図参照)。この溶媒系で、保持時間15分付近のピークを分取し、アセトニトリルを除去後、混在する塩を除くために繰り返し凍結乾燥することによりRK-1061Gの白色粉末2mgが得られる。

同様の方法にて、保持時間16分付近のピークを分取することにより、RK-1061H 2mgが得られる。

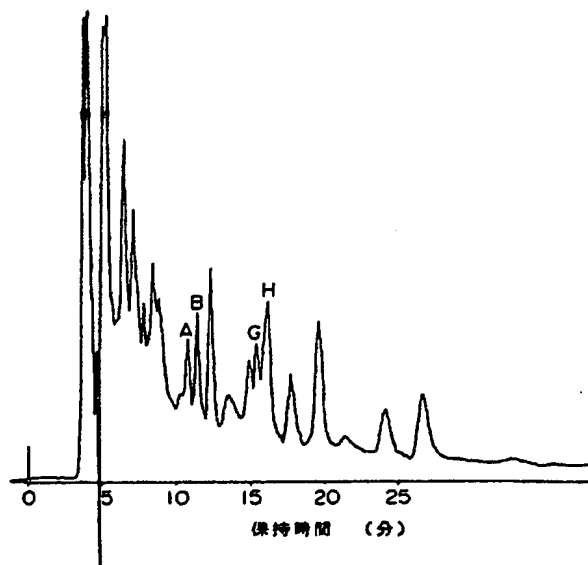
4. 図面の簡単な説明

第1図、第2図は、それぞれ、RK-1061G、RK-1061Hの核磁気共鳴スペクトルを示す図面であり、第3図は、高速液体クロマトグラフィーによるRK-1061G及びRK-

1061Hのピークを示すクロマトグラムである。

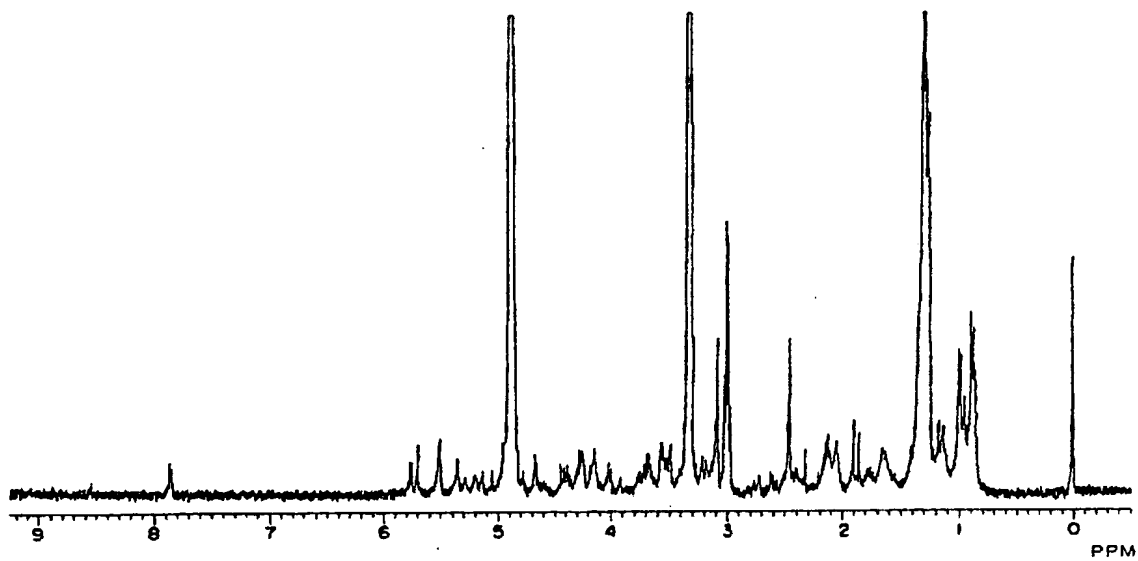
第2図中、AはRK-1061A、BはRK-1061B、GはRK-1061G、HはRK-1061H由来のピークを示す。

第3図

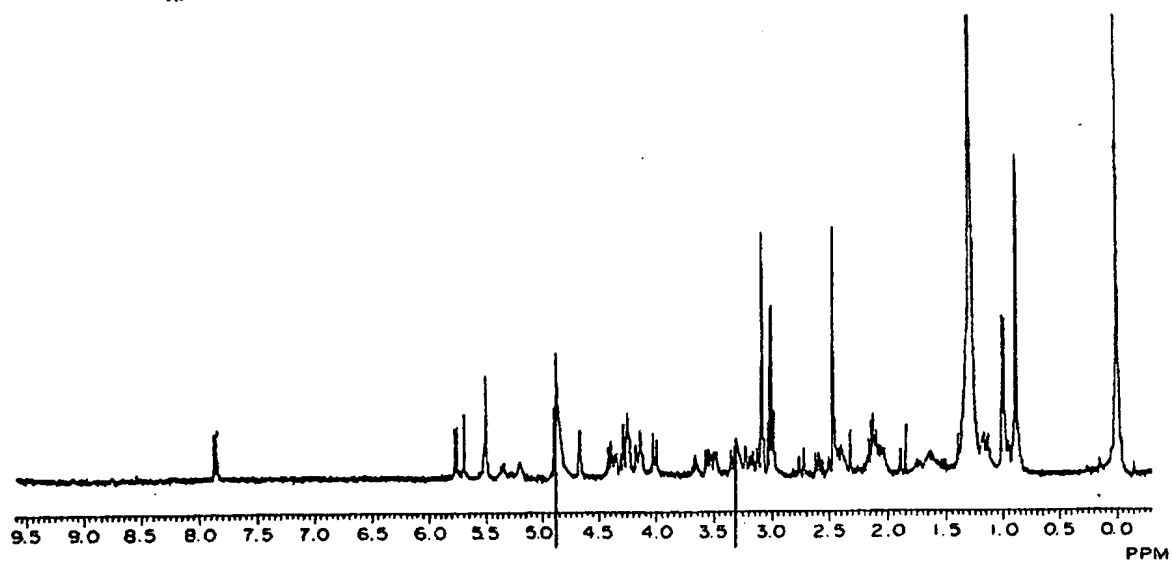


図面の符号(内容に変更なし)

第 1 図



第 2 図



手続補正書(方式)



1.9.20

平成 年 月 日

特許庁長官 吉田 文 毅 殿

1. 事件の表示 平成1年特許願第127079号

2. 発明の名称 抗生物質RK-1061G及び
RK-1061H並びにその製造法

3. 補正をする者

事件との関係 出願人

名称 (679) 理化学研究所

4. 代理人

住所 東京都千代田区丸の内3丁目3番1号
電話(代) 211-8741

氏名 (5995) 弁理士 中 村



5. 補正命令の日付 平成1年8月26日

6. 補正の対象 代理権を証明する書面
全図面



7. 補正の内容 別紙のとおり

願書に最初に添付した図面の弁書
(内容に変更なし)